

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
Please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

DERWENT-ACC-NO: 1987-144923

DERWENT-WEEK: 198721

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Microbial inoculum for accelerating degradation of organic matter - is

storage stable blend of aerobic, mesophilic soil fungi and bacteria

INVENTOR: RAMBIER, G H M

PATENT-ASSIGNEE: FERTIL FRANCE AGRO[FERTN], SOC  
FR FERTILISATO[FRFEN]

PRIORITY-DATA: 1985FR-0015396 (October 17, 1985)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES
MAIN-IPC			
EP 223661 A	May 27, 1987	F	025 N/A
FR 2588882 A	April 24, 1987	N/A	000 N/A
FR 2592892 A	July 17, 1987	N/A	000 N/A

DESIGNATED-STATES: AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU  
NL SE

CITED-DOCUMENTS: 2.Jnl.Ref; EP 125073 ; FR 2096887 ; FR  
2559478

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO
EP 223661A	N/A	1986EP-0402304

October 15, 1986

FR 2588882A N/A

1985FR-0015396

October 17, 1985

FR 2592892A N/A

1986FR-0000295

January 10, 1986

INT-CL\_(IPC): A01G031/00; C05F011/08 ; C09K017/00 ;  
C12N001/04

ABSTRACTED-PUB-NO: EP 223661A

BASIC-ABSTRACT: Microbial inoculum comprises a miit. of  
microorganism of

different which live in the soil and are non-pathogenic to humans,  
animals and

plants. The microorganisms are mesophilic, obligate or  
facultative aerobes,

used in storage-stable form, and decomposes cellulose,  
hemicellulose, liqnin

and proteins, of animal or plant orgin. Pref. microorganisms are  
cellvibrio

vulgaris; Bacillus cerus; corynebacterium aquaticum ( immobilised  
on a carrier)

and Trichoderma harzianum in the form of spores).

USE/ADVANTAGE - The inoculum, because of its ability to  
fecompose organic

matter in the soil, is useful as a fertiliser, opt. when formulated  
with an

agriculturally acceptable carrier, esp. other organic of (in)organic  
fertilisers. Used to improve nutrient assimulation in hydroponic  
cultures (on

straw or peat); to accelerate compositing of plant wasts, and to  
detoxify soils

(e.g. those contg. sorghum roots). The inoculum is a stable,  
powdered

formulation which is easy to use.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

TITLE-TERMS:

MICROBE INOCULATE ACCELERATE DEGRADE ORGANIC  
MATTER STORAGE STABILISED BLEND  
AEROBIC MESOPHILIC SOIL FUNGUS BACTERIA

ADDL-INDEXING-TERMS:

SOIL IMPROVE

DERWENT-CLASS: C03 D16 P13

CPI-CODES: C04-B02B1; C04-B02B2; C12-N07; C12-N08;  
C12-N10; D05-A04A; D05-H04;  
D05-H05;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 \*01\*

Fragmentation Code

M423 M781 M903 P113 P126 Q233 V500 V540 V550

Registry Numbers

87140 1286M

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1987-060399

19



Europäisches Patentamt  
Europ an Pat nt Office  
Office européen des brevets

11 Numéro d publication:

**0 223 661  
A1**

12

## DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

21 Numéro de dépôt: 86402304.9

51 Int. Cl.: **C 05 F 11/08, C 12 N 1/04**

22 Date de dépôt: 15.10.86

30 Priorité: 17.10.85 FR 8515396

71 Demandeur: SOCIETE FRANCAISE DE FERTILISATION  
" FERTIL FRANCE " AGRO BIO-INDUSTRIE, Site du  
Paradis, F-54980 Batilly (FR)

43 Date de publication de la demande: 27.05.87  
Bulletin 87/22

72 Inventeur: Rambler, Guy Henri Marie, Domaine des  
Légers, F-18000 Sainte-Montaine (FR)

54 Etats contractants désignés: AT BE CH DE ES FR GB GR  
IT LI LU NL SE

74 Mandataire: Warcoin, Jacques et al, Cabinet  
Régimbeau 28, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR)

56 Inoculum microbien et procédé de préparation d'une poudre stable de bactéries, agent fertilisant et son application, procédé pour l'amélioration des sols.

57 La présente invention concerne un inoculum microbien, utile notamment pour la dégradation des matières organiques dans les sols, composé d'un mélange de microorganismes de genres différents pouvant vivre dans le sol et non-pathogènes pour l'homme, les animaux et les végétaux, caractérisé en ce qu'il s'agit de microorganismes aérobies stricts ou aérobies facultatifs, et mésophiles, existant sous une forme résistante au stockage, dégradant la cellulose, l'hémi-cellulose, la lignine et les protéines composant les matières organiques d'origine végétale ou animale.

**EP 0 223 661 A1**

INOCULUM MICROBIEN ET PROCEDE DE PREPARATION D'UNE  
POUDRE STABLE DE BACTERIES, AGENT FERTILISANT ET  
SON APPLICATION, PROCEDE POUR L'AMELIORATION DES SOLS

Les rendements agricoles d'un sol, envisagés des points de vue qualitatif et quantitatif, sont bien sûr dépendants des facteurs climatiques, mais sont surtout directement proportionnels aux constitutions physique et chimique du sol.

Du point de vue chimique, l'eau, les substances minérales et les substances organiques constituent les facteurs essentiels de la richesse du sol. A cet égard, l'azote provenant de la dégradation des litières est particulièrement important mais est souvent perdu pour le sol, par formation d'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ). En effet, les litières, source principale de substances organiques, composées de débris végétaux et de cadavres d'animaux ou de bactéries, se décomposent à la surface du sol de deux façons :

La première voie de décomposition est une minéralisation rapide : 70 à 90 % de la matière organique est prise en charge par les microorganismes qui transforment en particulier l'azote en ammoniac, dont une parti se minéralise en nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ).

La seconde voie conduit à la formation d'humus, par formation lente de complexes colloïdaux organiques dont l'intérêt est de mettre en réserve de l'azote sous une forme non minéralisée.

5 Cet humus est par la suite lentement minéralisé (1 à 2 % par an).

Le problème de cette décomposition des litièr s en surface est qu'elle aboutit à une perte considérable d'azote sous forme de  $\text{NH}_3$ , de carbone sous forme de  $\text{CO}_2$   
10 et d'autres substances contribuant ainsi à un non-enrichissement du sol.

Il existe bien, dans les sols hydromorphes, une voie de dégradation anaérobie conduisant à la production de tourbe, mais cette minéralisation est  
15 lente et 30 % des matières organiques échappent à l'humidification, ce qui donne au sol une structure fibreuse néfaste.

C'est la volonté de récupérer toute cette énergie perdue pour le sol qui a conduit aux recherches  
20 qui sont à la base de la présente invention.

Les études concernant l'influence des micro-organismes sur les systèmes de nutrition des végétaux ont, pour l'instant, essentiellement porté sur le phénomène de vie symbiotique ; mais même les microorganismes  
25 non symbiotiques étudiés n'ont pu être utilisés en agriculture que de façon très spécifique. Or, les cultures intensives (grande culture, céréales oléagineux...) exportent une grande quantité d'humus, qui souvent n'est pas restituée par l'agriculteur. Il s'en suit alors une  
30 baiss continu du taux d matièr organique totale du sol et donc un risqu certain de battance. C tte battance responsable d'un manque d'aération du sol a pour

conséquence une mauvaise dégradation de la matière organique fraîche (résidu de récolte, paille, chaume, etc.) et par suite d'une augmentation de la flore fongique pathogène et donc d'une recrudescence des affections cryptogamiques pour les espèces végétales en culture.

D'autre part, il a été prouvé que la monoculture (céréales ou betterave par exemple) ou des rotations de cultures répétées (assolement) provoquaient des modifications au sein de la microflore du sol, en particulier la flore cellulolytique.

En effet, de nombreuses isolations et identifications à partir de prélèvements de sols cultivés ont montré une diminution de près de 50 à 75 % des bactéries cellulolytiques responsables en partie de la dégradation des résidus de récoltes (paille, chaume, etc.).

De plus, les cycles biologiques ou cycles d'assimilation des éléments nutritifs majeurs (N, P, K, S ...) ou mineurs (oligo-éléments) étant intimement liés au cycle du carbone (dégradation des celluloses, lignine, hémicellulose, pectine, protéine) et donc à la présence dans le sol de bactéries et champignons et leurs enzymes spécifiques, on comprend l'importance considérable de la matière organique fraîche et surtout de son évolution dans le sol.

La présente invention a pour objet un inoculum microbien contenant une forte concentration de micro-organismes spécifiques et sélectionnés, à utiliser dans les sols notamment pour accélérer la dégradation des résidus de récolte enfouis, d'en améliorer la valeur humique et fertilisante, en augmentant l'assimilation d la fumur chimiqu .

Plus particulièrement, la présente invention concerne un inoculum microbien, utile notamment pour la dégradation des matières organiques dans les sols, composé d'un mélange de microorganismes de genres différents pouvant vivre dans le sol et non-pathogènes pour l'homme, les animaux et les végétaux, caractérisé en ce qu'il s'agit de microorganismes aérobies stricts ou aérobies facultatifs, et mésophiles, existant sous une forme résistante au stockage, dégradant la cellulose, l'hémi-cellulose, la lignine et les protéines composant les matières organiques d'origine végétale ou animale.

Les microorganismes selon la présente invention sont choisis de préférence dans les genres *Cellvibrio*, *Bacillus*, *corynebacterium* et *Trichoderma*.

D'après les cultures en laboratoire et les contrôles d'activité, en test de croissance et production végétal les souches suivantes constituent le mode de réalisation préféré de l'invention : *Cellvibrio vulgaris* (FF 12) et *Trichoderma harzianum* (FF 13) pour leur activité enzymatique cellulolytique élevée et *Bacillus cereus* (FF 7) et *Corynebacterium Aquaticum* (FF 5) pour leurs actions spécifiques observées lors des tests de minéralisation effectués en essais agricoles.

Le *Trichoderma harzianum* est utilisé selon la présente invention, de préférence sous forme de spores, alors que les bactéries sont de préférence immobilisées sur un support solide.

Mais, un problème majeur rencontré lors de la manipulation de microorganismes dans le domaine agricole est son mode de transport, de conservation, et d'utilisation.

Il est souvent fait appel à des supports solides, du type gel de polyacrylamide, qui sont fort coûteux, encombrants et non-naturels : Ces supports, outre leur coût élevé, ne se mêlent pas à la biomasse végétale. Or, le

mélange microbien selon l'invention étant destiné à une utilisation agronomique, nécessite un support solide à base de produits naturels et peu coûteux.

Dans ce but, après de nombreux essais, on a découvert  
5 que le kaolin calciné, en particulier un kaolin dont la surface spécifique (évaluée par la méthode B.E.T.) est comprise entre, environ, 5 et 20m<sup>2</sup>/gramme, constituait un excellent support solide pour la fixation d'inoculum microbien ; ce kaolin a, de préférence, la granulométrie suivante (évaluée par la méthode BOUYOUCOS) : diamètre  
10 statistique médian de 1,5 à 8 microns ; il a aussi de préférence une perte au feu à 80°C de 0,2 à 0,8% ; ce kaolin calciné peut être, par exemple du type Oostacal, obtenu aux Etablissements LAMBERT RIVIERE.

En conséquence, la présente invention concerne également un procédé de préparation d'une poudre stable de microorganismes, caractérisé en ce qu'on mélange une biomasse humide des  
15 microorganismes avec un kaolin calciné et en ce que l'on sèche le produit de mélange. Le mélange peut être effectué dans un malaxeur à vitesse lente ; la biomasse humide peut être obtenue par centrifugation après une concentration des bactéries dans leur milieu de culture ; cette biomasse comporte, de préférence 10 à 30% de matière sèche ; il est préférable aussi, d'ajouter le kaolin calciné  
20 à la biomasse humide pendant le mélange ; enfin, le produit du mélange peut être séché à une température permettant de maintenir la viabilité des bactéries, soit de préférence, à une température  
25 comprise entre 30°C et 40°C.

La matière sèche ainsi obtenue à partir des bactéries immobilisées sur kaolin calciné, comme décrit précédemment, est mélangée dans des proportions définies aux spores de Trichoderma afin d'obtenir l'inoculum selon l'invention.

30 L'inoculum ainsi obtenu comporte, de préférence, 10<sup>9</sup> à 10<sup>11</sup> bactéries par gramme de matière sèche et 10<sup>8</sup> à 10<sup>10</sup> spores de Trichoderma par gramme de matière sèche. Il peut être utilisé comme agent fertilisant, seul ou en association avec un support acceptable en agriculture, tel qu'un fertilisant minéral et/ou  
35 organique, ou une matière d'origine végétal et/ou animale, ou des résidus organiques végétaux et/ou des fumiers.

Les applications agricoles de cet agent fertilisant sont multiples et très générales, s'opposant ainsi à la trop grande spécificité des "biofertilisants" connus.

Cet agent fertilisant, en effet, accélère la  
5 dégradation des matières organiques végétales. A ce titre, il peut être épandu sur le sol que ce soit en plein champ ou sous serre, et son action cellulolytique agit sur des débris végétaux broyés ou non.

Il est intéressant d'enfouir des matières organiques  
10 et l'agent fertilisant, par un travail du sol en profondeur, ou même d'épandre directement l'agent fertilisant dans le sol. En effet, les gaz tels que l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) et le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ), produits par la décomposition organique, peuvent être ainsi "piégés" et réutilisés par  
15 les végétaux sous une forme minéralisée.

L'utilisation de l'agent fertilisant selon l'invention peut aussi être envisagée très avantageusement pour les cultures hydroponiques hors sol, sur tourbe ou paille. Dans ce cas, l'assimilation des éléments fertilisants  
20 est grandement améliorée.

L'agent fertilisant selon l'invention peut également être utilisé pour détoxifier les sols, en particulier lors de l'enfouissement de débris toxiques tels que les racines de sorgho.

25 Ainsi, le procédé de préparation de l'inoculum bactérien comprend les étapes suivantes :

- a) culture des microorganismes en fermenteur ;
- b) fixation sur support solide ;
- c) préparation de l'agent fertilisant.

30 a) Culture des microorganismes en fermenteur

Milieux de culture

1) Un milieu de culture optimum a été défini pour les 3 souches de bactéries considérées, sa composition est la suivante :

- 5
- Cer llose, 40 g/l
  - Soyamine, 12 g/l
  - $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ , 15 g/l
  - $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ , 6 g/l
  - $\text{SO}_4 \text{Mg } 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 g/l
  - Extrait de levure, 0,5g/l

2) L'étude des conditions de sporulation de la souche de *Trichoderma harzianum* a conduit au choix du milieu suivant :

- 10
- $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , 5 g
  - $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ , 7 g
  - $\text{Mg SO}_4 7 \text{H}_2\text{O}$ , 1 g
  - $\text{CaCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$ , 1 g
  - Oligo-éléments MANDELS, 1 ml
- 15
- Extrait de levure à 5g/l, 1 ml
  - Pulpe de betterave + son, 100g (50/50)
  - Eau, Q.S.P. humidité, 65-70 %

Le pH de la solution des sels est ajusté à 3 avec de l'acide phosphorique.

20 Culture

Après stérilisation classique et ensemencement par un pied de cuve, la culture est poursuivie de 24 à 48 heures à une température de 18°C à 30°C avec une aération variant de 0,5 VVM à 1 VVM (Volume d'air par Volume utile par Minute).

25 b) Fixation sur support solide

Dès que la concentration maximum de bactérie est atteinte, la biomasse est récupérée par centrifugation et on obtient cette biomasse sous forme pâteuse à environ 20 % de matière sèche.

L'immobilisation sur support solide s'effectue par un mélange à parts égales biomasse humide et kaolin calciné (type Costacal obtenu aux Ets LAMBERT RIVIERE) avec les caractéristiques suivantes :

- 5                   - perte au feu à 80°C : de 0,2 à 0,8 %,  
                  - granulométrie (Méthode BOUYOUCOS) : Diamètre statistique médian de 1,5 à 8 microns.

10           Ce mélange est effectué dans un mélangeur genre malaxeur, à vitesse lente. Le kaolin calciné est ajouté lentement pour favoriser le mélange et permettre une meilleure homogénéité.

15           La poudre obtenue est alors séchée sous vide ou sous courant d'air sec à 30-40°C afin d'éliminer l'eau provenant de la biomasse humide.

                  On obtient ainsi un inoculum contenant de  $10^{10}$  à  $10^{12}$  bactéries par gramme de matière sèche.

                  Après contrôle de viabilité en tout de 7 mois le taux de viabilité est de 95 à 97 %.

20           Cette préparation est effectuée de façon identique pour les 3 souches de bactéries.

                  En ce qui concerne le *Trichoderma harzianum*, il est cultivé sur support solide dont les caractéristiques ont été définies précédemment. La culture se poursuit  
25           7 à 8 jours afin d'obtenir la sporulation.

                  Après séchage à 35°C, on obtient une poudre contenant  $8 \cdot 10^9$  spores par gramme de produit sec.

30           Les 4 poudres sont alors mélangées intimement à parts égales afin d'obtenir l'inoculum microbien dont les caractéristiques sont les suivantes :

\* Taux d bactéries :  $5 \cdot 10^9$  à  $5 \cdot 10^{10}$  bactéries par gramme de matière sèche

\* Taux de spores :  $10^9$  spores de *Trichoderma harzianum*.

c) Préparation d l'agent fertilisant

Cet inoculum microbien peut alors être mélangé à des fertilisants minéraux ou organiques ou des organo-minéraux.

5 Le mélange ainsi obtenu pourra être granulé ou pelletisé (presse).

Le produit ainsi obtenu pourra être épandu sur le sol et enfoui avec les résidus de récolte (pailles, chaumes, cannes de maïs, de tournesol, de colza, de sorgho, 10 résidus de betterave) ou tout autre résidu organique végétal provenant de l'industrie agro-alimentaire.

L'action des microorganismes ainsi épandus permet d'améliorer de façon notoire la dégradation de la matière organique présente dans ou sur le sol et ainsi 15 d'en valoriser les qualités fertilisantes et humiques.

Des applications de cet agent fertilisant ainsi que les résultats obtenus sont donnés dans les exemples suivants.

EXEMPLE 1

20 Action de l'inoculum microbien

Les expérimentations de culture en pots de l'Agrostis ont été menées en laboratoire.

Des séries de répétitions ont permis d'observer les résultats suivants :

25 1) A fumure équivalente, l'introduction de 500 mg d'inoculum microbien par pot permet d'augmenter la production végétale de l'Agrostis de 43 % pour deux coupes consécutives.

30 2) La toxicité de broyat des racines de sorgho incorporé au support de culture a été éliminée par l'adjonction de 350 mg d'inoculum microbien par pot.

**EXEMPLE 2****Action d'un mélange matière organique/inoculum microbien****a) Fabrication de l'agent fertilisant**

5 Le support organique a été préparé par compostage de pulpe de raisin et de fumier de bergerie puis séché à 95°C en four rotatif et enfin broyé.

A la poudre ainsi obtenue on a ajouté 1 % d'inoculum microbien.

10 Le mélange ainsi obtenu a été "pelletisé" à froid à la presse pour obtenir des "pellets" ou "bouchons" d'environ 3,5 mm de diamètre et 5 à 6 mm de long.

**b) Application****A) En laboratoire**

15 Des expérimentations ont été menées dans le cadre de l'étude du compostage aérobique strict des écorces de résineux.

20 Des mesures cinétiques ont montré que la dose optimum de l'agent fertilisant dont la préparation est décrite ci-dessus était de 2 à 5% de la quantité totale d'écorce (en matière sèche) et qu'il fallait y adjoindre de 0,5 à 0,75 % d'urée.

Dans ces conditions, la durée de compostage est diminuée de moitié.

**B) En plein champ et sous serre**

25 On a utilisé le même agent fertilisant que précédemment.

**1) Culture sous serre**

Ces applications sous serre froide ont été conduites sur culture de laitue.

30 En préparation de sol, 2 000 kg à l'hectare d'engrais organo-minéral 3.10.10 + 400 kg d Patenkali

ont été utilisés. Sur les parcelles traitées l'agent fertilisant a été amené à raison de 500 kg/ha.

En 60 jours de culture, le gain moyen par salade a été de 125 g (345 g contre 220 g sur les témoins).

5 Des résultats analogues ont été obtenus avec la culture des fraises, des tomates et des endives.

## 2) Culture en plein champ

### a) Dégradation de la matière organique

10 L'agent fertilisant précédemment décrit est utilisé à raison de 400 kg/ha lors du déchaumage après broyage des pailles, chaumes ou cannes de maïs ou colza et céréales.

15 Après épandage de l'agent fertilisant le sol est travaillé sur une profondeur de 15 à 25 cm afin d'enfouir matière organique et agent fertilisant.

Les observations effectuées ont montré une nette accélération de la dégradation des pailles, chaumes et cannes, même sur terre battante.

### b) Amélioration de la productivité

20 - Blé sur Maïs : variété FESTIVAL      témoin : 91 quintaux  
traité : 107 quintaux

Gain : 16 quintaux

- Blé sur blé : variété HARDY      témoin : 77,2 quintaux  
traité : 84,6 quintaux

25 Gain : 7,4 quintaux

- Vigne : les applications de l'agent fertilisant ont été effectuées à raison de 600 kg/ha avec des écorces de résineux semi-compostées, et ce à l'automne.

30 Les résultats ont montré un gain moyen de 1 200 kg de raisins à l'hectare. Il est à noter que l'on a observé un fort effet antichlorotique.

**EXEMPLE 3 : Composition et analyse microbiologique d'un agent fertilisant selon l'invention**

1) On prépare un agent fertilisant ayant la composition suivante :

5 **SUPPORT** (pourcentages exprimés par rapport à la totalité de l'agent fertilisant)

. Pulpe de fruits préfermentée dont

- matière organique totale ..... 49,5 %

- azote total ..... 3,0 %

10                    dont azote organique ..... 2,2 %

. Oligo-éléments ..... 0,4 %

. Acides aminés ..... 1,2 %

**INOCULUM MICROBIEN** : 1 à 2 milliards de microorganismes par gramme d'agent fertilisant, soit 0,5 % à 1 % d'inoculum  
15 par rapport à la totalité d'agent fertilisant, dont :

. Flavobactérium ..... 0,4 à 0,6.10<sup>9</sup> bact/gr

. Bacillus ..... 0,4 à 0,6.10<sup>9</sup> bact/gr

. Cellvibrio ..... 0,2 à 0,3.10<sup>9</sup> bact/gr

. Trichoderma ..... 10<sup>4</sup> spores/gr.

20                    Le mélange ainsi obtenu est présenté sous forme de pellets de 3,5 mm de diamètre.

2) De l'analyse microbiologique de cet agent fertilisant effectuée par la méthode de RUSCH (méthodes de culture biologique), il ressort les caractéristiques suivantes :

25 **VALEUR NUTRITIVE**

La valeur selon le test était de 2800. Dans les tableaux cela correspond à très bien. Ce chiffre donne le nombre de bactéries qui se développent dans de l'au ordinaire, selon le procédé standard. Plus il y a de bactéries,  
30 plus la valeur nutritive sera grande quand celles-ci meurent.

Les meilleurs composts apparus sur le marché jusqu'à maintenant avaient seulement une valeur de 2000.

#### FERTILITE

La valeur selon le test était de 8900. Dans les  
5 tableaux cela correspond à très bien. Ce chiffre donne le nombre de bactéries qui se développent dans de l'eau sucrée selon le procédé standard. Plus il y a de bactéries, plus il y en aura qui vivent en contact étroit avec les racines. Ici encore la valeur est plus élevée que cell  
10 des meilleurs composts qui n'ont qu'une valeur de 5000.

Selon les tableaux, il est possible d'appliquer une méthode de culture plus biologique, c'est-à-dire avec moins d'engrais chimiques et moins de pesticides.

#### 15 EXEMPLE 4 : Influence de l'agent fertilisant de l'exemple 3 sur le compostage

##### 1. Préparation des tests

Afin de savoir dans quelle mesure l'agent ferti-  
20 lisant de l'exemple 3 influence la décomposition de la matière organique, on a préparé dans le laboratoire un test de compostage.

Comme matière organique, on a utilisé de l'écorce d'arbre, celle-ci étant connue comme la matière organique  
25 la plus dure. Cette écorce a été mise dans deux simulateurs de compostage et on a suivi la décomposition pendant 10 jours à 25°C.

Dans l'un des deux simulateurs, on a ajouté 5 % de l'agent fertilisant de l'exemple 3.

30 Pour connaître le degré de décomposition, on a mesuré la quantité d'oxygène utilisée pendant celle-ci. Chaque 3 h 30 on a fait des mesures afin de suivre le processus.

##### 2. Résultat des tests

On peut constater une différence entre la vitesse de compostage avec et sans l'agent fertilisant de l'exemple 3.

A - Les deux premiers jours

5            Pendant cette période, la matière la plus facile à décomposer a été décomposée, ce sont les sucres et les albumines présents dans l'écorce.

10           La vitesse de décomposition est environ 30 % plus élevée avec l'agent étudié que sans lui. Ceci prouve que la matière organique qui se décompose facilement, se décomposera 30 % plus vite avec l'agent fertilisant selon la présente invention.

B- Après le deuxième jour

15           A partir de ce moment commence la décomposition du matériel qui est plus difficile à décomposer, comme la cellulose et la lignine. Celles-ci sont les matières les plus importantes pour la formation de l'humus. La vitesse de décomposition sans l'agent selon la présente invention diminue jusqu'à moins de 50 % par rapport à la vitesse des deux premiers jours.

20           L'écorce traitée avec l'agent de l'exemple 3 continue à avoir la même vitesse de décomposition que celle des deux premiers jours. Ainsi, après 10 jours, la décomposition a été le double par rapport à celle du contrôle. Finalement

25           la vitesse de décomposition de la matière dure de l'écorce est environ 3 fois plus grande avec l'agent étudié que sans. L'agent de l'exemple 3 contient donc des bactéries plus aptes à décomposer la matière dure que les bactéries qui le font normalement.

30           Puisque c'est la matière la plus dure qui fournit la plus grande quantité d'humus, l'agent fertilisant selon l'invention est très apte à produire plus rapidement de l'humus.

EXEMPLE 5 : Action de l'agent fertilisant de l'exemple 3. Test sur tomates en serres1) INFORMATIONS TECHNIQUES

Désinfection du sol en 1984 avec bromure de méthyl.

Engrais organique : 1000 kg de fumier par are

Analyse du sol	: pH : 6,2	Ca : 112	Mg 21,5
	p : 71	Sel : 150	
	K : 47	% C : 2,16	

Engrais chimiques : 3 kg  $K_2SO_4$ , 2 kg Floranid et  
2 kg  $KN O_3$  par are

Variété : Vedettos

Plantées le : 23 mai 1985

Plantées à une densité de : 2 plants par  $m^2$

Agents fertilisants de l'exemple 3 : 400 kg/ha à une profondeur de 15 cm, le 22 mai 1985.

2) OBSERVATIONS DES PLANTES

On n'a pas constaté de différences significatives entre les plantes, ou de maladies pendant la période de croissance. On a cependant constaté des différences significatives de récolte.

3) MESURES

Le test a été exécuté à 3 reprises sur 10  $m^2$  chacun. Ceci signifie 20 plantes à chaque fois. Les lignes du bord n'ont pas été récoltées de sorte que les chiffres sont dérivés de  $3 \times 10 = 30$  plantes.

La première récolte a eu lieu le 23.07.1985, la dernière le 7.10.1985, Au total, il y a eu 24 récoltes. A chaque date de récolte on a noté les poids et le nombre de fruits par classe de qualité.

Les classes de qualité répondent aux normes suivantes :

CLASSE	TAILLE DU FRUIT (mm)	QUALITE
EE	70 - 80	Extra
A	60 - 70	1ère ou 2ème classe
B	50 - 60	1ère ou 2ème classe
C	45 - 50	1ère ou 2ème classe
"potage"	moins de 45	1ère ou 2ème classe
"Gros morceaux"	plus de 80	3ème classe

#### 4. DONNEES SUR LE RAPPORT

##### A) Rapport en poids

TRAITEMENT	RECOLTE EN kg	RAPPORT EN %
Témoin	106,70	100
Agent fertilisant de l'exemple 3	121,95	114

##### B) Divisé par classe de qualité

Classe	EE	A	B	C	"Potage"	"Gros morceaux"
Témoin	69	265	328	221	164	53
Agent fertilisant de l'exemple 3	110	342	147	77	110	58

##### C) Taille des fruits

Traitement	Récolte en kg	Nombre de fruits	Poids moyen des fruits
Contrôle	106,70	1100	97 g
Agent fertilisant de l'exemple 3	121,95	844	114 g

## 5. INTERPRETATION DES RESULTATS

L'agent selon l'invention a une influence positive sur le rapport en poids, ainsi que sur la qualité des tomates.

5 Le rapport en poids est de 14 % plus élevé ; il y avait donc une meilleure nourriture pour les plantes.

Le nombre de fruits a diminué, ce qui signifie qu'on était déjà près du maximum pour les tomates. La plante règle naturellement le nombre de ses fruits. Dans  
10 le cas d'un trop grand nombre de fruits, la plante rejette les petits, afin de pouvoir nourrir optimalement les grands. On voit donc un glissement vers une classe de qualité supérieure.

Ce glissement se passe également pour la répartition par taille de fruits où l'agent fertilisant étudié joue  
15 un rôle intéressant. En effet, le nombre de tomates dans les catégories EE et A, les plus intéressantes, est nettement plus grand avec ledit agent, alors que dans les classes B, C et "Potage" c'est l'inverse.

20 L'agent fertilisant a un bon effet en serres où l'on fait régulièrement une désinfection du sol. Un rétablissement de la vie du sol peut considérablement améliorer la nutrition des plantes. Un déblocage du processus de décomposition augmente la disponibilité des éléments  
25 nutritifs qui ne le sont même pas assez avec un apport d'engrais chimiques.

### . Test sur betteraves sucrières

#### 1. INFORMATIONS TECHNIQUES

Culture précédente : Orge d'hiver

30 Fumure verte : 30 tonnes d fumier d'établ

Analyse du sol :  $P_2O_5$  = 28 CaO = 785

$K_2O$  = 16 Ph-KCl = 7,8

MgO = 9 Humus (%C) = 1,8

Date de labour : fin mars  
 Azote : 1ère dose : 70 u      2ème dose : 55 u  
 Semées le : 22.04.1985  
 5 Semées à dis-  
 tance de : 17 cm x 45 cm  
 Variété : Allyx  
 Agent de  
 l'exemple 3 : 150 kg/ha avant la préparation du sol

## 2. MESURES

10 Le test a été exécuté à 3 reprises sur 600 m<sup>2</sup>  
 chacun. A chaque reprise on a pris 15 bandes de 10 m de  
 longueur. On a noté les poids et déterminé la teneur en  
 sucre. Ces chiffres ont été extrapolés par rapport aux  
 récoltes par Ha, pour les racines ainsi que pour les  
 15 sucres.

	<i>Contrôle</i>			Agent fertilisant de l'exemple 3		
	<i>Rapports Racines kg/ha</i>	<i>Teneur Sucre %</i>	<i>Rapport Sucre kg/ha</i>	<i>R. R. kg/ha</i>	<i>T. S. %</i>	<i>R. S. kg/ha</i>
20 <i>Parcelle 1 :</i>	56,881	17,26	9.818	59.629	18,32	10.924
<i>Parcelle 2 :</i>	59,391	17,73	10.530	61.341	18,16	11.140
<i>Parcelle 3 :</i>	57.513	17,85	10.266	59.328	17,61	10.448
<i>Moyenne :</i>	57.928	17,61	10.205	60.099	18,03	10.838
<i>Différence :</i>				+ 2.171 kg + 0,42 % + 633 kg		

## 25 3. COMMENTAIRES SUR LES RESULTATS

Le rapport en racines ainsi que le rapport en sucre  
 est plus élevé après application d'agent fertilisant selon  
 la présente invention.

AUTRES TESTS

De nombreux essais, similaires à ceux précédemment décrits, ont été effectués.

On a ainsi constaté les actions favorables de l'agent fertilisant de l'exemple 3 sur la germination et l'implantation du maïs ainsi que sur la minéralisation de l'azote.

5

DEPOT DE SOUCHES

Les souches suivantes ont été déposées le  
11 octobre 1985 à la Collection Nationale de Cultures  
de Microorganismes de l'Institut Pasteur, 28, rue du  
Docteur-Roux, 75724 PARIS CEDEX 15, sous les numéros  
suivants :

- 5 - pour la souche FF 5, *Corynebacterium Aquaticum*  
(précédemment identifiée comme étant probablement  
*xanthomonas* sp ) ..... n° I-480
- 10 - pour la souche FF 7, *Bacillus Cereus*  
variété *Mycoides* ..... n° I-481
- pour la souche FF 12, *pseudomonas* sp  
(*cellvibrio vulgaris*) ..... n° I-482
- 15 - pour la souche FF 13, *Trichoderma*  
*harzianum* ..... n° I-495

REVENDECATIONS

- 1) Inoculum microbien utile notamment pour la dégradation des matières organiques dans les sols, composé d'un mélange de microorganismes de genres différents pouvant vivre dans le sol et non-pathogènes pour l'homme, les animaux et les végétaux, caractérisé en ce qu'il s'agit de microorganismes aérobies stricts ou aérobies facultatifs, et mésophiles, existant sous une forme résistante au stockage, dégradant la cellulose, l'hémi-cellulose, la lignine et les protéines composant les matières organiques d'origine végétale ou animale.
- 2) Inoculum selon la revendication 1, caractérisé en ce que les microorganismes sont choisis dans les genres *Cellvibrio*, *Bacillus*, *Corynebacterium* et *Trichoderma*.
- 3) Inoculum selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un mélange de *Cellvibrio vulgaris*, *Bacillus cereus* et *Corynebacterium Aquaticum* et *Trichoderma harzianum*.
- 4) Inoculum selon la revendication 3, caractérisé en ce que *Trichoderma harzianum* est sous forme de spores.
- 5) Inoculum selon la revendication 3, caractérisé en ce que les bactéries sont immobilisées sur un support solide.
- 6) Inoculum selon la revendication 5, caractérisé en ce que le support solide est du kaolin calciné.
- 7) Inoculum selon la revendication 6, caractérisé en ce que le kaolin calciné a une surface spécifique comprise entre 5 et 20 m<sup>2</sup>/gramme.

8. Inoculum selon l'un des revendications 3 à 7, caractérisé en ce qu'il contient de  $10^9$  à  $10^{11}$  bactéries par gramme de matière sèche et  $10^8$  à  $10^{10}$  spores de Trichoderma par gramme de matière sèche.

5 9. Agent fertilisant caractérisé en ce qu'il est constitué d'un inoculum selon l'une des revendications 1 à 8, seul ou en mélange avec un support acceptable en agriculture.

10 10. Agent fertilisant selon la revendication 9, caractérisé en ce que le support acceptable en agriculture comporte des fertilisants minéraux et/ou organiques.

15 11. Agent fertilisant selon l'une des revendications 9 et 10, caractérisé en ce que le support comporte des matières d'origine animale et/ou végétale.

12. Agent fertilisant selon la revendication 11, caractérisé en ce que le support comporte des résidus organiques végétaux et/ou des fumiers.

20 13. Agent fertilisant selon l'une des revendications 9 à 12, caractérisé en ce que l'inoculum représente de 0,1 à 5 % en poids de l'agent fertilisant.

25 14. Procédé de préparation d'une poudre stable de bactéries entrant dans la constitution de l'inoculum selon les revendications 6 ou 7, caractérisé en ce qu'on mélange une biomasse humide des microorganismes avec un kaolin calciné et en ce que l'on sèche le produit du mélange.

30 15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que le mélange est effectué dans un malaxeur à vitesse lente.

16. Procédé selon l'une des revendications 14 et 15, caractérisé en ce que la biomasse humide comporte de 10 à 30 % de matière sèche.

17. Procédé selon l'une d s r revendications 14 à 16, caractérisé en ce que le kaolin calciné est ajouté pendant le mélange à la biomasse humide.

5 18. Procédé selon l'une des revendications 14 à 17, caractérisé en ce que le produit du mélange est séché sous vide à une température comprise entre 30 et 40°C.

10 19. Procédé pour l'amélioration des sols, caractérisé en ce qu'il consiste à épandre sur ou dans les sols, ou à enfouir avec des matières organiques végétales, un agent fertilisant selon l'une des revendications 9 à 13.

15 20. Procédé pour l'amélioration des sols, selon la revendication 19, caractérisé en ce que les matières organiques végétales sont des résidus de récolt .

20 21. Procédé pour l'amélioration de l'assimilation des éléments fertilisants, caractérisé en ce qu'il consiste à utiliser un agent fertilisant selon l'une des revendications 9 à 13, en culture hydroponique hors sols sur tourbe ou paille.

22. Application d'un agent fertilisant selon l'une des revendications 9 à 13 à l'accélération du compostage des déchets végétaux.



Office européen  
des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0223661

Numéro de la demande

EP 86 40 2304

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 4)
X	EP-A-0 125 073 (NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION)  * Revendications 1,3; page 11, lignes 25-28; page 10, ligne 34 - page 11, ligne 2 *	1,2,4, 9,10, 19,20, 22	C 05 F 11/08 C 12 N 1/04
Y	---	14-18	
Y	FR-A-2 096 887 (H. GRIFFON) * Revendications 1-3 *	14-18	
Y	---	14-18	
X	---	1,2	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 4)  C 05 F 9/00 C 05 F 11/00 C 12 N 1/00 C 12 R 1/00
	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 105, no. 4, 28 juillet 1986, page 326, résumé no. 29244e, Columbus, Ohio, US; Y. OHTA et al.: "Rapid microbial deodorization of agricultural and animal wastes", & EUR. CONGR. BIOTECHNOL., 3rd 1984, 3, 129-34 * Résumé en entier *		
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 21-01-1987	Examineur BOUTRUCHE J.P.E.

Form 1503 U3 82

## CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

- X : particulièrement pertinent à lui seul  
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie  
A : annexe-technologique  
O : divulgation non-écrite

- T : théorie ou principe à la base de l'invention  
E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date  
D : cité dans la demande  
L : cité pour d'autres raisons